

⑯ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
 ⑫ 公開特許公報 (A) 平1-201156

⑮ Int.Cl.⁴
 G 01 N 33/483
 C 12 M 1/34
 G 01 N 33/543

識別記号 序内整理番号
 E-7055-2G
 F-8717-4B
 Q-7906-2G※

⑯公開 平成1年(1989)8月14日
 審査請求 未請求 請求項の数 21 (全12頁)

⑭発明の名称 磁気的分離デバイスおよび不均質検定における使用法

⑯特 願 昭63-289940
 ⑯出 願 昭63(1988)11月16日

優先権主張 ⑯1987年11月16日 ⑯米国(U.S.)⑯121191

⑯発明者 メイ・ケイ・リ アメリカ合衆国マサチューセッツ州01701, フレイミング
 ム, デインスモア・アベニュー 50, アパートメント
 104

⑯発明者 ジャック・ケスター アメリカ合衆国マサチューセッツ州01721, アシュラン
 ド, キヤリエージ・ハウス・バス 23

⑯出願人 ジーンートラック・システムズ アメリカ合衆国マサチューセッツ州01701, フレイミング
 ム, ニュー・ヨーク・アベニュー 31

⑯代理人 弁理士 湯浅 勝三 外4名

最終頁に続く

明細書の添付(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

磁気的分離デバイスおよび不均質検定における
 使用法

2. 特許請求の範囲

1. 磁性粒子から成る固相を用いる検定法において使用するための磁気的分離装置であって、

a) 上記の磁性粒子を含むよう適合させた非
 鉄製容器を受け入れるための多数のオリフィスを
 もつベース手段；

b) 各々の受け入れ用オリフィスの周囲の周り
 で間隔が置かれた、上記ベース上で取付けられる
 多数個の磁石手段であって、該磁石手段の各々が
 上記受け入れオリフィスを通る断面平面と同一平面
 である一つの方向において南北磁場方位をもち、
 かつ、上記磁石手段の上記南北磁場の各々が一つ
 の共通方向において配向される、磁石手段；
 から成る装置。

2. 上記の受け入れ用オリフィスが4個の磁石手
 段により周囲の周りでかこまれている、請求項1

記載の装置。

3. 磁性粒子から成る固相を用いる検定法において使用するための磁気的分離装置であって、

a) 上記の磁性粒子を含有するよう適合させた非鉄製容器を受け入れるための多数個のオリフィスをもつベース手段；

b) 各々の受け入れ用オリフィスの周囲の周りで間隔をとって上記ベース上にとりつけられる多数個の磁石手段であって、該磁石手段の各々が上記受け入れ用オリフィスを通る一つの断面平面と同一平面である方向において南北磁場方位を保有し、かつ、その南北磁場方向配列上記受け入れ用オリフィスの各々の周囲の周りで一つの共通方向で動いて、その前にある磁石の南北磁場方位からほぼ180°異なる、磁石手段；

から成る装置。

4. 上記の磁石手段が稀土類コバルト磁石である、請求項1記載の装置。

5. 上記磁石手段が稀土類コバルト磁石である、請求項3記載の装置。

6. 上記磁石手段が33Hネオジム鉄鋼素磁石である、請求項4記載の装置。
7. 上記磁石手段が33Hネオジム鉄鋼素磁石である、請求項5記載の装置。
8. 上記ベース手段が96個の受入れオリフィスをもち、上記装置が117個の33Hネオジム鉄鋼素磁石から成り、そして、上記ベース手段がアルミニウムとプラスチックから成る群から選ばれる物質でつくられる、請求項7記載の装置。
9. 上記磁石が約0.13×0.13×0.5インチの寸法をもつ、請求項目記載の装置。
10. 非鉄質マイクロチューブ容器を受け入れかつ上記ベース手段とかみ合わせるよう適合させたチューブ移送手段からさらに成り、それによって、各々の非鉄質マイクロチューブ容器が一つの受入れオリフィスによって受取られかつ多數個の磁場によってとりかこまれる、請求項1記載の装置。
11. 非鉄質マイクロチューブ容器を受取りかつ上記ベース手段とかみ合うよう適合させたチュ

ーブ移送手段からさらに成り、それによって、各々の非鉄質マイクロチューブ容器が一つの受入れオリフィスによって受取られ、かつ多數個の磁石によってとりかこまれる、請求項3記載の装置。

12. 鉄質固相マイクロ粒子を利用する、リガンド特異的結合性物質による免疫検定またはハイブリダイゼーションによって液体試料中でリガンドを検出する方法であって、その際その改良が、固相結合リガンドあるいはリガンド特異的結合性物質を上記液体試料中に存在する未結合のリガンドまたはリガンド特異的結合性物質から分離するために、請求項1記載の磁気的分離装置を用いることから成る、方法。

13. 鉄質固相微細粒子を利用する、リガンド特異的結合性物質による免疫検定またはハイブリダイゼーションによって液体試料中でリガンドを検出する方法であって、その際その改良が、固相結合リガンドまたはリガンド特異的結合性物質を上記液体試料中に存在する未結合のリガンドまたはリガンド特異的結合性物質から分離するために、

請求項3記載の磁気的分離装置を用いることから成る、方法。

14. 磁性粒子から成る固相を用いる検定法において使用するための磁気的分離装置であって、
a) 上記磁性粒子を含有するよう適合させた非鉄質組成物のマイクロウエル・トレー手段を受入れるよう適合させたベース手段；
b) 上記マイクロウエル・トレー手段と間隔を置いて並んで上記ベース上に取りつけられる多數個の磁石手段であって、それにより、上記マイクロウエル・トレー中の各々のウエルがそれに隣接して、該ウエルを通る一つの断面平面と同平面である一つの方向において南北磁場方位を保有する少くとも一つの磁石手段をもち、そして、その場合に、上記磁石手段の上記南北磁場の各々が一つの共通方向において配向されている、磁石手段：から成る装置。
15. 磁性粒子から成る固相を用いる検定法において使用するための磁気的分離装置であって、
a) 上記磁性粒子を含有するよう適合させた

非鉄質容器を受入れるための多數個のオリフィスをもつベース手段；

b) 各々の受入れオリフィスの周囲の周りで間隔をとって置かれた、上記ベース上で取つけられた多數個の磁石であって、その場合、該磁石の各々は上記受入れ用オリフィスを通る一つの断面平面と同平面である一つの方向で南北磁場方位を保有し、そして、方位の南北磁場方向は、上記受入れ用オリフィスの各々の周囲の周りの一つの共通方向で動いて、前にある磁石の南北磁場方位の配向からほぼ180°異なる、複数個の磁石；から成る装置。

16. 上記ウエルの各々が4個の磁石手段によって周囲の周りでとりかこまれている、請求項13記載の

17. 上記ウエルの各々が4個の磁石手段により周囲の周りでとりかこまれる、請求項13記載の装置。

18. 上記の磁石手段が稀土類コバルト磁石である、請求項16記載の装置。

19. 上記の磁石手段が稀土類コバルト磁石である、請求項18記載の装置。

20. 磁性粒子から成る固相を用いる検定法において使用するための磁気的分離装置であって、

a) 上記磁性粒子を含有するよう適合させた多数個のマイクロウエルを含む非鉄質トレーを入れるためのベース手段；

b) 液体取出し穴から成るカバー手段および該カバー上で間隔を置いて該カバー上にとりつけられた多数個の磁石手段であって、それによって、上記カバーと上記ベースおよび上記トレーとの組合せが各ウエル周囲の周りの多数個の磁石手段と各ウエルと並ぶ液体取出し穴との並置をもたらし、その際、上記磁石手段が上記ウエルを通る一つの断面平面と同平面である一つの方向で南北磁場方位を保有し、そして、上記磁石手段の上記の南北磁場の各々が一つの共通方向において配向される、カバー手段と磁石手段：

から成る装置。

21. 磁性粒子から成る固相を用いる検定法に

おいて使用するための磁気的分離装置であって、

a) 上記磁性粒子を含有するよう適合させた複数個のマイクロウエルを含む非鉄質トレーを入れるためのベース手段；

b) 上記ベース上で間隔がとられ上記ベース上にとりつけられた多数個の磁石手段から成り、それによって上記ベースと上記トレーとの組合せが各ウエル周囲の周りで多数個の磁石手段の並置をもたらすベース手段であって、その場合、上記ウエルの各々が4個の磁石手段によって周囲の周りでとりかこまれ、かつ、南北磁場方位は、上記ウエルの各々の周囲の周りの一つの方向で動いて、前にある磁石の南北磁場方位からほぼ約180°変る、ベース手段；
から成る装置。

3. 発明の詳細な説明

発明の分野

本発明は不均質型検定を実施するのに有用なデバイスに関するものであり、さらに特定的にいえば、微細磁性粒子あるいは鉄質粒子を使用する免

疫検定およびハイブリダイゼーション型検定に関して使用するための新しい磁気的分離デバイスを記述するものである。

発明の背景

近年、健康管理は検定法の入手性および改善のために劇的に大きな尺度で進歩した。検定は各種の病気状態と相関をもちあるいは関連する特定の化学的構成成分、すなわち、リガンドを検出する。リガンドは、それへ選択性に結合しがち検査されるべき試料中に存在するかもしれない他の化学的構成成分へは結合しないリガンド結合性特異物質との結合反応を通して主として検出される。各種の創意的技法により、そのような結合反応の存在または欠如を検出することができ。従って測定される試料中のリガンドの存在または欠如を検出することができる。

ここで特許請求される発明が関係する二つ主な種類の検定法が存在し、これらは免疫検定とハイブリダイゼーション検定を含む。免疫検定は以前から存在しており、抗体をその抗体が特異的であ

る抗原との間の反応の特異性に基づいている。はじめに用いられた抗体はポリクローナル起源のものであり、例えば、抗体は、それが望まれる抗体による挑戦に続いて動物中でつくり出された。その後は、コラーゼンとミルシュタインによる1975年(Nature 225: 1061)の革新的開発に続いて、モノクローナル抗体が好まれてきており、それは、それらがより容易につくることができ、親和性および結合活性による精巧な選択を可能にするからである。

さらには、抗体および/または抗原を標識化する各種の技法が存在しており、それらには、同位元素標識、蛍光性分子、化学発光分子、酵素、光散乱性粒子、エネルギー転移、スペクトル的にマッチ(matched)する分子の対の間の組立て(scheme)などの採用が含まれる。これらの技法は当業においてよく知られており、ここで詳細に見直して見る必要はない。しかし、二つのかけはなれた種類の検定、すなわち、均質検定と不均質検定を区別することは極めて重要である。均質は操作上見地から最

も望まれ、何故ならば、その検定実施のための反応全体および反応剤の添加が、最終的な検出段階とともに、单一溶液中でおこるからである。従って、時間がかかりかつ誤差をひきおこし得る機械的操作が回避されるが、しかし、所望の感度で以てその種の検定法を開発することの技術的側面は相当なものである。対照的に、数多くの検定法が不均質系に基づいて実施され、その場合には、一般的にはある型の固相物質を含む一つの溶液の中でいくつかの段階が実施される。検出されるべき反応は溶液中か固相上のいずれかにおいておこり、続いて分離段階が行なわれ、それによって未反応成分、および汚染性影響物が効果的に除去され得る。結果は一般的には、追加的な機械的操作を使用してより高い水準の感度にある。慣用的な不均質検定は溶液から手によって容易に除き得るディップスティック (dipstick)、あるいは同じように手軽な移送を可能にする大きいビードを用いてきた。ラテックスまたは類似物質から一般的には成るより小さいビードは液体からの隔離のためにフィル

ターおよび／または遠心法に頼ってきた。大きい磁性粒子を用いる概念もまた開発されており、スミスらにより米国特許4,272,510および4,292,920において記載される。特定的にいえば、スミスらはBB型粒子の使用、および容器から容器へ固相を取出すための電磁的にエネルギーを与えられた釘 (nail) を用いることによって溶液から上記BB粒子を取出すこと、を述べている。多少あかぬけしないけれども、スミスらの方法は、汚染性影響をしばしば与える容器壁が、検出可能反応が固相上でおこるともちろん仮定して、取除かれるという利点を実験にもっている。しかしこれらの方法は、すべての固相粒子を別の容器へ取出しそして／あるいは移すことができない故に、特に微細な磁性または鉄質粒子の場合にそうであるよう、正確さを損うという実質的危険性に悩む方法である。そのような微細粒子はスミスらによって記述されている大ビードよりも大いに好まれるものであり、なぜならば、それらは反応がおこり得るはるかに大きい表面積をもつからである。感度

は従って劇的に改善される。

コーニング社 (ロチェスター) は磁気的分離デバイスを商業的に入手可能なものとしたが、それは検定反応剤混合物と磁性粒子固相成分とを含む大きい、例えば1.2mm×7.5mmの試験管で以て使用するよう意図されている。コーニングのデバイスは試験管を受入れるための水平な成型されたうね部分をもち、それによって粒子は試験管の片側へ引きつけられるようになって液の除去を可能にする。コーニングのデバイスの設計はしかし、小容積の試料について使用するのに最適化されておらず、従ってそのような応用については最適なものとなし得ず、従ってその利用性が制限されている。

本発明の一つの目的は、小容積の検定について使用可能であり、あるいは一度に>60の検定に使用できる、磁性微細粒子を用いる検定で使用するデバイスを提供することである。

本発明のもう一つの目的は、マイクロタイヤー型トレーで以て用いることができ、それによって多數の検定を同時に実施し得るデバイスを提供することである。

することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、鉄質固相物質と一緒に使用する、オートクレーブ滅菌ができる分離デバイスを提供することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、自動化ピベット系へ手軽に適合させ得る磁気的分離デバイスを提供することである。

本発明のさらにもう一つの目的は、各試験管内で1個、2個または4個の鉄質粒子引付け位置を提供するよう適合させ得る、磁気的分離デバイスを提供することである。

より最近に使われるに至ったもう一つの種類の検定法は核酸プローブの標的核酸によるハイブリダイゼーションに頼るものである。標的核酸は一般的には伝染性微生物、例えばバクテリア、ビールスなどと関連するものであり、ただし、特異的細胞ゲノムの検出もまた期待される。非常に単純化した説明によると、ハイブリダイゼーション検定は相補的ヌクレオチド塩基の間の大きいペアリング (pairings) に依存している。特定

的にいえば、好ましいペアリングはアデニンと、チミジン、グアニンおよびシチジンとの間である。デオキシリボ核酸(DNA)の各鎖は一連の前記塩基で構成され、一方、その相補鎖は合致するが相補的の系列のDNA塩基から成る。このように、二本鎖核酸を一本鎖へ解離させることができ、そして相補的配列をもつ核酸で構成されるプローブで以て、そのプローブが相補的位置においてのみ標的核酸へハイブリッドされる二本鎖核酸をつくり出しえる。

DNAはリボ核酸(RNA)に転写され、それはウラシルがチミジンに置換されること以外には同じ四つの塩基のリボヌクレオチドでまた構成される。その転写方式のゆえに、そのRNA配列はまたDNA配列に対して相補的であり、従って同じ塩基確認情報を含む。このように、微生物または細胞のRNAを、標的RNAを相補的配列を含むプローブへハイブリッドさせることによって、同じようにして検出し得る。核酸プローブの生成と調合は、比較的最近の発展であるが、よく知ら

れた技術でありかつ文献中によく記載されている。この点において助けになる文献はマニアチスらの、クローニング・マニュアルであり、その関連部分は、ここで言及した文献とともに本明細書において参照して組入れられている。

容易に測定し得るとおり、免疫検定に関して用いられる同じ技法の多くは標識化であり、不均質／均質系をハイブリダイゼーション検定へ適用できる。特に、不均質検定における固相物質の使用はハイブリダイゼーション検定を特別に有用にさせる技法である。微細磁性粒子の利用はしかし、主として、現在の磁気的分離デバイスをハイブリダイゼーション検定へ適用できないことのために、平凡なことではない。

そこで、本発明のもう一つの目的は、ハイブリダイゼーション検定と鉄質固相粒子とに関して有用である、適切な磁気的分離デバイスを提供することである。

発明の要約

本発明の原理と目的によると、不均質の免疫検

定および／またはハイブリダイゼーション検定において使用するための磁気的分離デバイスが提供されるのであり、それは、試料と鉄質粒子を含めた検定成分(assay component)を保持する非鉄製容器を受け入れるための多数のオリフィスをもつベースから成り、上記鉄質粒子は自然の磁性を示しても示さなくてもよい。このオリフィスの各々は、好ましくは多數個、最も好ましくは4個であって、かつ最も好ましくはオリフィス周囲の周りに等距離で間隔を置いた磁石によってとりかこまれている。各磁石の南北磁場方位は好ましくは、受け入れ用オリフィスを通る一つの断面平面と同一平面であり、従って、容器の総体的に並んでいる軸に対し垂直である方向においてその非鉄製容器の上に突き当るよう、配向される。従って、この好ましい実施態様におけるすべての磁石はベースとの関係において一つの単一特定方向で一線上に並んでいる。一層好ましくは受け入れオリフィスの周囲の周りの磁石の南北磁場方位は180°方向が変る。このように、各オリフィスの周囲の周り

で一つの共通の方向、例えば時計周りまたは反対周りですむことによって磁石の磁場方向を検査してみると、第一の磁石は次の磁石とは180°反対にある南北磁場方向をもち、その磁石はこんどはその次の磁石と180°反対にある、等々、の結果となる。このようにして、周囲の周りにある他の磁石はどれも実質的に同等の磁場配向をもつ。

このデバイスの最も好ましい実施態様はさらに、複数の非鉄質容器へあるいはそれらから同時に液をビペットすることができる、室内装置付きビペット手段から成る。その他の実施態様はさらに、非鉄製容器の各々の内部で反応剤を搅拌しつつその非鉄製容器を保温するための手段、および、複数個の非鉄製容器を受け入れ用オリフィスへかみ合わせかつ取り出すためにベース手段をかみ合わせるよう適合させた移送スライド、から成る。

本発明の他の実施態様は非鉄製容器内で1個または2個のスポット引付け部位を与える受け入れ用オリフィス－磁石配向から成り、一方、4個の磁

石によってかこまれた受入れ用オリフィスをもつ最も好ましい上記実施態様は4個のスポット引付け部位をもたらす。

液体試料中のリガンドについての免疫検定またはハイブリダイゼーション検定において、本発明の磁気的分離デバイスから成る新規の方法が提供されている。

詳細記述と最良方式

図1は本発明の磁気的分離デバイスの好ましい実施態様を示している。それはミクロニック④型チューブのようなマイクロチューブを有利に収容し、最も好ましくは、それは96個のその種のチューブを同時に12列×12列で収容するようつくれる。そのような配列は96個のウェルを提供するマイクロタイター④型トレーに関して普通に使用されているものと類似である。その他の製造者は、例えばカリホルニア、エメリービル、セタスからのプロペト・ビベット系のようなその種のトレーと一緒に使用するための付属デバイスをつくっている。96試料フォーマットを有利に提

供することによって、本発明のデバイスは研究室においてすでに存在しているその種の自動化デバイスと一緒に潜在的に使用できる。

図1はマイクロチューブ(図2を見よ。No.20)を受入れるための多數の受入れオリフィス3をもつ分離器デバイスのベース1を示している。最も好ましくは、ベースは非鉄物質または非磁性物質で構成され、アルミニウムのような金属から機械製作されあるいは適当プラスチックから成型されるのが有利であり得る。最も好ましいのは、それらの物質はオートクレーブ殺菌のような代表的滅菌手段に耐えるように選ばるべきである。オリフィス3の周囲をとりかこんで、磁石5を受入れるための機械加工オリフィス6(あるいは成型オリフィス6)があり、その磁石はベース1の表面および受入れ用オリフィス3の断面と同一平面である。

ネオジム鉄硼素磁石がすべて図1の8に示されるのと同じ「北」方向で並んでいる場合には、これが約500-600ガウスの受入れ用オリフィス内の磁場強度をもたらすことが発見された。し

かし、磁石が図1の9に示すとおりの別の「北」パターンをもち、例えば各オリフィスの周囲の時形回り方向ですすむように磁場が180°方向を変える場合には、その種の配向が受入れオリフィス内で磁場線を集中させることができたことに発見され、磁場は約1400-1600ガウスへ増加した。この驚くべき配向の結果として、アドバンスド・マグネットックス社から入手し得るもののような、磁性微細粒子分離の劇的増加が溶液内でおこる。明らかなように、分離はマイクロチューブ内の4領域または4スポットの引付け部位の局在化をもたらす。本発明の磁気的分離デバイスのそれほど好ましくない実施態様では、ベース1中の受入れ用オリフィス3の間で均等に分散された、24個または59個のようなより少ない数の磁石を利用するが、それによって、それぞれ1個または2個のスポット引付け部位が各マイクロチューブ内でおこる。

最も好ましくは、用いられる磁石5は永久磁石であり、最も好ましくは、強力磁場を保有する。

磁場が強いほど、分離はより有効であり、かつその分離が迅速である。最も好ましい磁石は、インディアナ州バルバライソのIG・テクノロジーズから入手できる。稀土類ネオジム-鉄硼素磁石である。0.13インチ×0.13インチ×0.5インチの磁石が、商業的に入手できるマイクロチューブを収容する受入れオリフィス3の間でオリフィス6中で適切に設置され得るよう、必要な強度と寸法の要請事項を保持するものとして有利に使用される。マイクロタイターブレート幾何形体にあるオリフィス6はマイクロタイターブレートの頂部あるいは底部から設置できることが、製造者のブレート幾何学に基づいている。

磁石5は機械工作オリフィス6の中へ押しつけてよいが、その他の技法を使用してもよい。例えば、ベース1をインベストメント鋳型法によって製造することができ、それによって磁石オリフィス6は磁石5とより密接に合致する寸法と形状を保有する。また別に、ベース1は射出成型法によるようにプラスチックから製造されてもよく、そ

の方法はまた磁石受入れオリフィス6にはまりこむ形態で精密な公差を可能にする。

図2は図1において示される磁気的分離デバイスと一緒に使用するための移送トレーを示している。移送トレー21はマイクロチューブ20を受入れるためのチューブ受入れオリフィス23を保持している。チューブ移送トレー21はさらにトレー脚22を含み、それは、移送トレー21を、表面から十分な距離だけ支持してマイクロチューブ20の装填を可能にするのに役立ち、かつまたマイクロチューブ20を受入れオリフィス3(図1)とをかみ合わせる際にトレー脚で以て整列および垂直高の調節を与えるのに役立つ。

受入れトレー21はさらに、検討実施中の作業者が、分離された微細粒子をそれらのスポット引付け部位から溶液中へ物理的に押しやるために搅拌手段へ、マイクロチューブ20を移すのを助ける。このチューブ移送トレー21はさらにマイクロチューブを保温ブロックへ移して特定的検定が実施されるのに必要とされるとおりに温度制御環境

境を提供するのを助ける。

図3は最も好ましい実施態様の透視図を示しており、その場合、アルミニウムのような非鉄金属からつくられた受入れ用ベース31はマイクロチューブを収容するように寸法を与えられた、この場合も好ましくはアルミニウムの、シリンダー33を収容するように機械加工される。受入れ用ベース31の機械加工された領域はまた、各々の受入れチューブ33が4個の磁石35によってとりかこまれるように磁石35を収容する寸法がまた与えられている。最も好ましくは、磁石35の磁場方位が前に論じたのとは別のパターンで配列される。磁石35およびチューブ33はベースのカバー32によって所定の位置に保持され、カバーはスクリュー、接着剤、リボンなどによって受入れ用ベース31へ永久的に固定されてもよい。この最も好ましい実施態様は9個の受入れ用オリフィス37で以て示されているが、この構成の実施態様は図1に示す96個までの受入れ用オリフィス(必要ならばより多くの)へ規模を大にすること

ができる。

図4は受入れ用ベース/分離器41の透視図を示し、移送トレー42がそれとかみ合い状態にあり、マイクロチューブ43がその中に設置されている。室内装置付きチャネル・ビペット44が、マイクロチューブへかつ／またはそれから液体連結チューブ47を通して液体ポンプ機構(図示せず)へ液体をビペットするのに用いられる。特定の列または特定の欄の中にある各々のマイクロチューブについての個別ビペットをもつビッテー44は心合せ脚45と心合せ穴46とのかみ合せによって、受入れ用ベース/分離器41とかみ合う。

図5は分光光度計中で測定される光強度によって決定されるときの、粒子移動速度対磁気方位の測定に向けた実験の結果を示す。図を検討すると明らかに理解されるとおり、すばらしい、驚くべき、そして予想外の粒子移動速度の増加が本発明のデバイスにおいて、交番磁極を用いるときに觀察されるのは明らかである。單一方向性の軸が一

般的にはないものの試料について適切であるにもかかわらず、交番極は血液などを含む試料のような粘性試料に関して明瞭に好ましい。従って、本発明の好ましい実施態様は図1の領域9において示すとおり交番磁極を利用する。

本発明はマイクロニック④型のマイクロチューブを引用して特定的に記述してきたが、本発明の原理はマイクロタイター型トレイの実施態様へ容易に適用され得る。特定的にいえば、図において示される実施態様に対する明瞭な機械的変更はマイクロタイタートレーを適切に受入れかつ磁石をウエルと並置して置くために必要とされるであろう。好ましくは、その配置は少くとも4個の磁石を利用することを含み、各ウエルの周囲の周りで均等に間隔がとられることが有利である。最も好ましくは、地場方位が、オリフィスの周囲あるいはマイクロタイター・トレーのウエルを受入れる他の領域の周囲において時計回りまたは反対回りの方向で磁石を用いるときに、各磁石とほぼ180°変る。マイクロタイター・トレイを受入

れるためのベースの実際の物理的具体化は被覆された磁石の露出を含んでいてよく、それによって、ベース上面上でのマイクロタイタートレーの配置は磁石をマイクロタイター・トレーのウエルの間で上向きに突出させる。あるいは別に、そして、固体底 (solid bottom) をもつタイプのマイクロタイター・トレーに関して特に、ベースは単純にマイクロタイター・トレーを収容し、下向きに突出した磁石を含むカバーがマイクロタイター・トレーとかみ合い、それによって、磁石がマイクロタイター・ウエルの間で下向きに突出する。液体取出しのために頂部プレート中に穴が設けられる。この開示と、そして特に付属図面から与えられると、当業熟練者は最もよいマイクロタイター・トレーを収容するための適当な物理的構造を容易に決定するであろう。

このデバイスの採用は以下のバイブリダイゼーション検定試料におけるその使用を見直すことによって明らかになるであろう。この実施例を前記の開示と付図と一緒に検討することにより、免疫

検定におけるそれと類似の採用は当業熟練者にとって明らかとなり、彼らの技能の範囲内に十分にあることになる。

実施例1 リステリア モノシトゲンの検出

リステリア モノシトゲン (*Listeria Monoctonus*) についてのDNAプローブ検出を、0.5-1.5μの直径の磁性粒子（アドバンスト・マグネックス社）をその磁性粒子の表面へ共有的に結合させたオリゴdT₁₄と一緒に使って実施した。ベースは選択されたマイクロタイター・プレート（タイターテク/95個ウエルのプレート）とかみ合っているプレートの中へ接着させた117個の磁石で構成されていた。この検定のマイクロタイター・プレートをベースとかみ合わせるとき、そのマイクロタイター・プレート中の各ウエルは各四分円において1個の磁石をもち、それによって前述のとおりに上澄液からの磁性粒子の分離を行なわせた。

リステリアの一晩培養体を37°Cにおいて、ブレインハート・インフュージョン・プロス(brain

heart infusion broth) の中で増殖させ、この試料培養体の1μlを下に規定するとおりのプロセシング (processing) 緩衝液の1μlへ添加し、合計7.0μlの混合物を各マイクロタイター・プレート・ウエルへ添加した。

プロセシング緩衝液

5MGuSCN (グアニジンイソチオシアネット)
0.30M トリス-HCl, pH 7.5 (トリス-[ヒドロキシメチル]アミノメタン)
0.10M Na₂EDTA (エチレンジアミンテトラ酢酸)
20%デキストランサルフェート(分子量5000)
(重量/容積)

160dAの残基 (residue) を尾部にもつDNAの35merのオルゴヌクレオチドの2.0μl (2.5MGuSCN中で35ng/μl, 1.0nM EDTA, pH 7.5) を各ウエルへ添加し、37°Cで15分間保温した。

ビード反応剤緩衝剤 (以下で規定するとおりの) 中の140μgのdT₁₄誘導磁性ビード (5μg/μlのdA50結合能力) を各ウエルへ添加した。

ビード反応剤緩衝剤

トリス-HCl 0.1M, pH 7.4

アセチル化 BSA 0.5% (牛血清アルブミン)
100μg/μl 超音波処理・子牛胸腺DNA
1.0mM EDTA
4% サボニン
0.5% サルコシル
0.5M NaCl
0.1% アザイド
0.01% シリコン消泡剤

磁性ビードをマイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって分離し、上澄液を取り出し、0.1μlの洗滌緩衝液 (wash buffer) 1を各ウエルへ室温で添加し、プレートを117個の磁石を含むベースから切り離したのちに、ビードを再懸濁させた。

洗滌緩衝液1

1M GuSCN
トリス-HCl, 0.1M, pH 7.4
アセチル化 BSA 0.5%
10μg/μl 子牛胸腺DNA
EDTA 1.0mM
0.1% ナトリウムアザイド
サルコシル 0.5%
サボニン 1%
消泡剤

磁性ビードを、マイクロタイター・プレートを

117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって再度分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液1を室温において添加し、プレートを117個の磁石を含むベースから切り離したのちに再度懸濁させた。

65μlの化学的溶離剤 (chemical eluant) (次に規定する)を各ウエルへ添加し、構成体を混合し、37℃で2分間保温した。

化学的溶離剤

2.5M CuSCN
トリス-HCl、0.1M、pH 7.4
10μg/ml 超音波処理した牛子牛胸腺DNA
アセチル化 BSA 0.5%
EDTA 10mM
1.0% サボニン
0.5% サルコシル

磁性ビードを、マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって分離し、各ウエルからの溶離剤を、E.coliの3'-端からクローンされたP³²リボブロープの1.4ng/ml濃度の5μlを含む新鮮なウエルへ移した。混合物を37℃で4分間保温し

た。

反応剤中の140μlのビード(>5μg/mlのdA50結合能力)を各ウエルへ添加し、37℃で2分間保温し、ビードはマイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースと37℃においてかみ合わせることによって、磁気的に分離した。

上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2(以下で規定する)を各ウエルへ添加し、ビードを37℃において、ベースをマイクロタイター・プレートから切りはなしたのちに、再分散させた。

洗滌緩衝液2

トリス 0.1M、pH 7.4
100μg/ml E.coli DNAまたはt-RNA
EDTA 10mM
アセチル化 BSA 0.5%
0.5M NaCl
0.5% サルコシル

磁性ビードはマイクロタイターを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって分離され、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃において添加し、プレートを117個の磁

石を含むベースと切りはなしたのちに、ビードを再懸濁させた。

マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって磁性ビードを分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃において添加し、プレートを117個の磁石を含むベースから切りはなしたのちにビードを再懸濁させた。

磁性ビードを、マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃において添加し、プレートを117個の磁石を含むベースから切り離したのちに再懸濁させた。

マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって磁性ビードを分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃において添加し、そして、プレートを117個の磁石を含むベースから切りはなしたのちに、ビードを再懸濁させた。

マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって磁性ビードを分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃において添加し、そして、プレートを117個の磁石を含むベースから切りはなしたのちにビードを再懸濁させた。

磁性ビードを、マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃において添加し、そして、プレートを117個の磁石を含むベースから切りはなしたのちにビードを再懸濁させた。

磁性ビードを、マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによって分離し、上澄液を取り出し、0.1mlの洗滌緩衝液2を37℃で添加し、そして、プレートを117個の磁石を含むベースから切りはなしたのちにビードを再懸濁させた。

100μlの洗滌緩衝液2を各ウエルについて添加し、68℃において2分間保温した。

マイクロタイター・プレートを117個の磁石を含むベースとかみ合わせることによってビードを磁気的に分離し、上清液を取り出し、シンチレーション液体へ移し、次に各バイアル中のP³¹量をベックマン1800シンチレーション・カウンターを使用して測定した。リストリアの存在は、それが対照標準ウエル中で存在しないときより一桁大きいP³¹カウント数によって確認された。

4. 図面の簡単な説明

図1は磁気的分離デバイスの平面図であり、図1Aは磁石の設置を示している。

図2はマイクロチューブを磁気的分離デバイスへおよびそれから、移動させるための移送トレーの透視図である。

図3は磁気的分離器デバイスの一つの好ましい実施態様を示している。

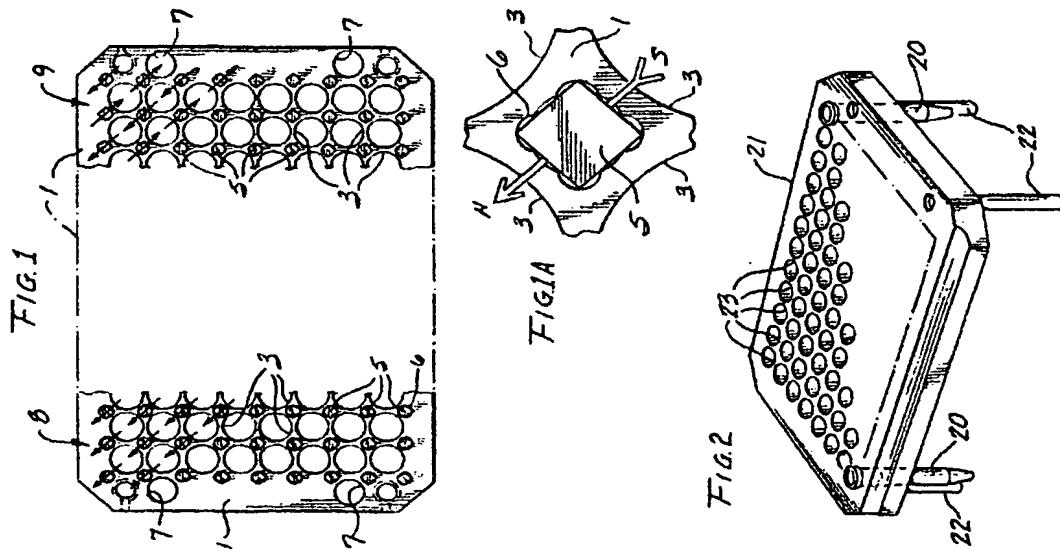
図4は磁気的分離器デバイス上に案内装置付きの8チャンネル型のアスピレーター／ピベッターで以て取りつけられたマイクロチューブ・トレーの透視図を示す。

図5は單一方向磁極の場合と比べて、交番磁極をもつ分離器において得られる、驚異的かつ予想外の速度利点を示している。

図6は廃液の除去を容易にするための間連する8チャンネル型の真空ヘッドを備えた磁気的分離器デバイスの透視図を示している。

代理人弁理士湯浅恭三
(外4名)

図面の記述内容に変更なし)



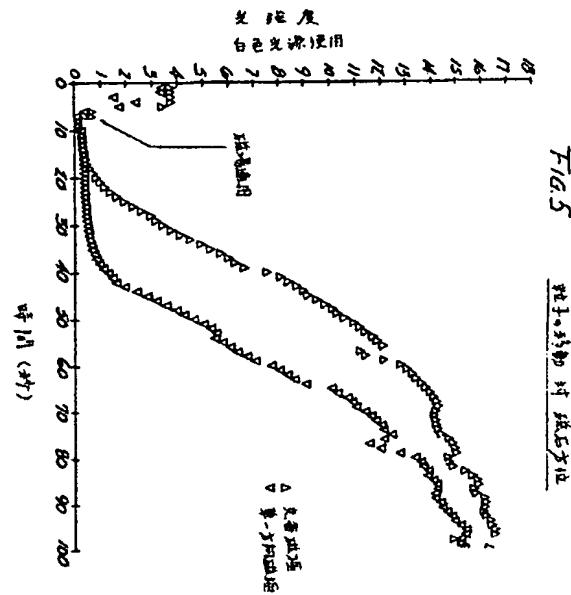
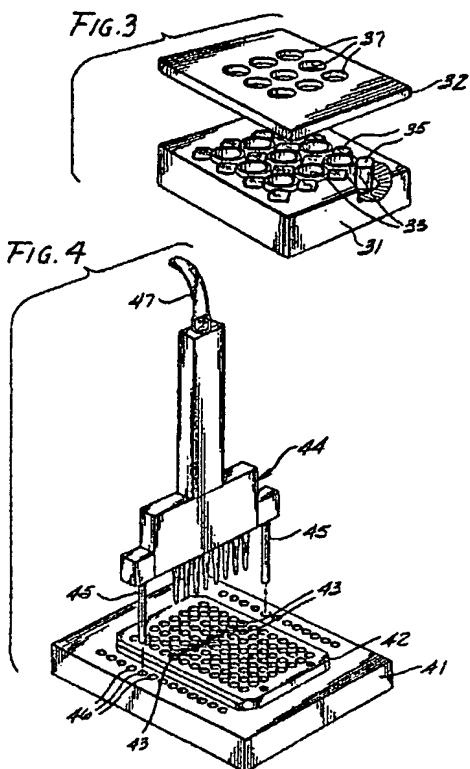
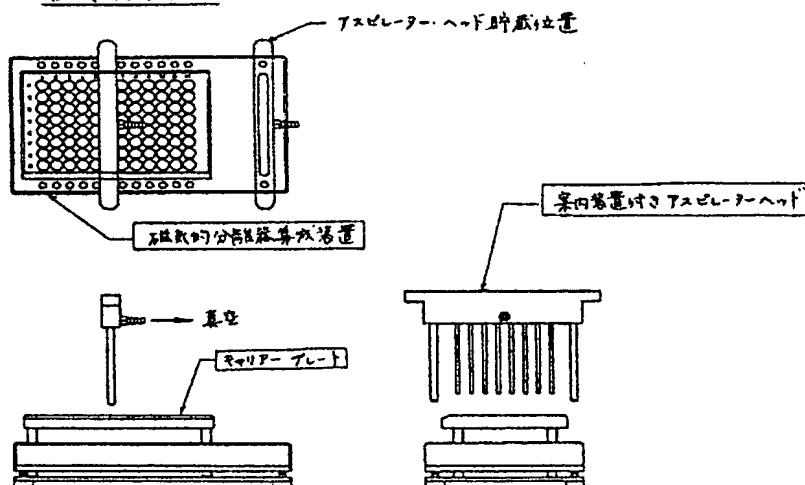


FIG.6 磁気的分離器系



第1頁の続き

⑥Int. Cl. 4 識別記号 庁内整理番号
 G 01 N 33/553 7906-2C
 // C 12 Q 1/68 A-6807-4B

⑦発明者 デービッド・ティー・ アメリカ合衆国マサチューセッツ州01581, ウエストボロ, マクタツガート・ストリート 9
 パック

手 続 極 正 告

平成元年 / 月 24 日

特許庁長官 吉田文毅

1. 事件の表示

昭和63年特許願第289940号

2. 発明の名称

磁気的分離デバイスおよび不均質検定における使用法

3. 指正をする者

事件との関係 特許出願人

住所

名 称 ジーンートラック・システムズ

4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル 206区

電話 270-6641~6

氏名 (2770) 弁理士 湯浅 信三



5. 指正の対象

出願人の代表者名を記載した顔写

委任状及訳文

凍結した明細書

適正な図面

6. 指正の内容

別紙の通り (尚、明細書及び図面の内容には変更なし)

